대한간학회지 제 5 권 제 4 호 1999 ; 291－298

신이식 후 HBsAg 양전된 환자에서 'a' determinant의 염기서열 검색

연세대학교 의과대학 내과학교실, 소화기병 연구소1, 외과학교실2

최병현 · 한광협 · 정효영1 · 백용한 · 정정일 · 김유선2 · 전재윤 · 문영명

Abstract

Sequence Analysis of 'a' Determinant in Two Patients with De Novo HBV Infection after Renal Transplantation

Byung Hyun Choe, M.D., Kwang Hyub Han, M.D., Hyo Young Chung1
Yong Han Paik, M.D., Jung Il Chung, M.D., Yoo Sun Kim, M.D.2
Chae Yoon Chon, M.D. and Young Myoung Moon, M.D.

Department of Internal Medicine, Department of General Surgery1
and Institute of Gastroenterology2, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: HBV infection can be seen after organ transplantation. The presence of anti-HBs in serum means protection from HBV infection. If amino acids were mutated in 'a' determinant which was a common antigenic epitope of HBsAg, escape from humoral immunity can occur. Recently, in chronic HBV infected patients who received liver transplantation but reinfected by HBV, many authors reported mutations in 'a' determinant sequence. However, in renal transplantation, there were few reports about HBV infection and 'a' determinant mutation after transplantation. Therefore, we studied the incidence of HBV reinfection after renal transplantation and also tried to analyze 'a' determinant sequence in those patients. **Methods:** We reviewed HBsAg-negative patients who received renal transplantation in our hospital, but turned HBsAg positive after transplantation. We selected two patients who were anti-HBs positive before transplantation but turned HBsAg positive after transplantation, and analyzed 'a' determinant of amino acid sequence of these patients. **Results:** Among 1682 patients who were HBsAg negative before transplantation, 21 patients were turned HBsAg positive after transplantation. Among them, 6 patients were anti-HBs positive before transplantation. Sequence analysis of the 'a' determinant amino acid in two patients whose HBsAg turned positive after transplantation revealed no evidence of mutation in comparison with previously reported subtype 'a' determinant sequences. **Conclusion:** In renal transplantation, HBV could be reinfected in patients who had been anti-HBs positive before transplantation even without mutation in 'a' determinant region. (Korean J Hepatol 1999;5:291－298)

Key Words : Renal transplantation, HBV infection, 'a' determinant, Mutation

■ **책임저자** : **한광협**, **서대문구 신촌동 산 134번지 연세대학교 의과대학 내과학교실**

서 론

간이식 후 B형 간염이 재발하는 환자들에 대하여는 수 차례 보고가 있었으며, 재감염이 생기는데 대하여 몇 가지 기전으로 설명하고 있는데, 첫째, 낮은 바이러스 농도로 인해 측정이 않된 경우, 둘째, 수술 전후의 면역 억제 요법으로 인한 체액성 면역의 감소 그리고 수동면역을 장기간 예방적으로 시행함으로써 발생하는 돌연변이의 출현 등이 그 기전으로 알려져있다.

신이식 후의 HBV 감염에 대하여는 1980년 말과 90년대 초에 몇차례 보고가 있었다. 하지만 신이식 후에 새로이 발생한 B형 간염의 발생률과 이들 환자에서 HBsAg 'a' determinant의 염기서열의 분석을 통한 야생형과 변이형의 여부에 대해서는 아직 보고된 적이 없다.

이식 전에 anti-HBs음성인 환자는 신이식 후에 HBsAg이 양전되면서 간염의 양상을 나타낼 수있으나 이식 전에 항체가 있었던 환자는 항체가 지속되는 한 야생형 HBV에는 재감염되지 않는 것으로 알려져 있다.

항체와 항원이 공존하는 환자의 경우는 대부분이 표면 항원의 친수성 중심부에 변이가 있음을 알게 되었다. 또한 백신을 시행한 경우에 대부분의 항체가 이 부위에 결합하며, 특히 면역성이 높은 부위는 아미노산 124번에서 147번까지로서 이부위를 'a' determinant라고 명명하였다. 최근에는 이 부위에 8개의 cysteine이 고리구조를 형성하며, 이 구조가 항원성 결정에 중요함이 알려졌으며, 만일 이 부위 중 어느 한 codon에 변이가 생길 경우 항원성이 없어져 항체 중화반응으로부터 회피할 수 있는 것으로 생각하고 있다.[1-3]

본 연구자들은 첫째, 신이식 후 새로이 발생한 HBV 감염의 발생 빈도와 임상적 특성을 살펴보았고, 둘째, 신이식 전 anti-HBs가 양성이었음에도 신이식 후 HBsAg이 양성화한 환자 중 HBV S 유전자의 'a' determinant 부위를 분석하여 변이형에 의한 감염 여부를 확인하였다.

대상 및 방법

연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원에서 1979년부터 1998년까지 신이식을 시행받은 후 정기적으로 관찰 중인 환자를 대상으로, 이들의 의무기록을 토대로 이식 전 HBV표지자 상태를 확인하였고 이식 후 경과 관찰 중 간수치 이상으로 HBV 표지자 검사를 실시하여 HBsAg이 양전된 환자의 자료를 검색하여, 이들의 임상경과를 확인하였다.

대상 환자 중 신이식 전 HBsAg 음성이었고 anti-HBs가 양성이었으나, 신이식 후 정기적으로 추적검사를 시행하던 중 HBsAg이 양성으로 전환되었고 간염의 임상상을 보였던 환자 중 2명을 대상으로 혈액을 채취하고 HBV S유전자의 'a' determinant부위에 대하여 염기서열을 분석하였다.

염기서열 분석은 codon number 124번에서 147번까지의 'a' determinant에 대하여 시행하였으며, 기존에 염기서열이 알려진 adw2 subtype을 정상대조로 하여 비교하였다.

이를 간단히 기술하면 환자의 혈청에서 phenol/chloroform/isoamyl alcohol로 바이러스 DNA를 추출하여 최종산물을 ?20℃에서 보관하였다. 'a' determinant 부위의 증폭은 S412 ATCCTGCTGCTATGCCTCAT (sense nucleotide 412 431)및 S718 ACTGAAAGCCAAACAGTGGG (antisense nucleotide 699 718)의 시발체 쌍(Bioneer, Chungwon, Korea)을 이용하여 PCR 방법으로 시행하였다.

PCR 용액은 viral DNA 10 μl, 10X buffer 2 μl, primer 0.5 μl each, dNTPs (10 mM) 1 μl, Taq polymerase (Takara, OTSU, Japan) 0.5 μl 그리고 DW 5.5 μl로 총 20 μl로 구성하였다. PCR 조건(GeneAmp PCR System 9600; Perkin Elmer, Norwalk, USA)은 94℃, 55℃, 72℃ 에서 각각 1분씩 40 cycle을 시행하였고 PCR 산물의 정제는 PCR 정제 kit (Qiagen, Valencia, USA)를 사용하였다.

정제한 PCR 산물을 T4-DNA ligase를 이용하여 pGEM-T easy vector (Promega, Madison,

USA)에 ligation한 후 competent cell (XL1 blue)에 전형하였다. 간략하면 ligation은 PCR 산물 3㎕, pGEM-T easy vector 1 ㎕, T4 DNA ligase 1 ㎕, ligation beffer 1.5 ㎕ 와 DW 8.5 l등 총 15 ㎕를 4℃에서 하룻밤 반응 시켰다. Ligation 산물을 competent cell 200 ㎕에 첨가한 후 얼음에 30분간 두고 42℃에서 60 90초 간 보온시킨 후 얼음에 2분간 보관했다. LB medium 3 ml에 37℃로 1시간 보온한 후 8000rpm에서 1분간 원심분리하고 LB medium을 버린 후에 LB plate (X-gal, IPTG, ampicillin 함유)에 확산 배양했다. 하룻밤 동안 37℃에 보온한 후 백색 군락 만을 선택하여 LB medium에 배양했고 plasmid 정제 후 insertion을 확인하고 염기서열을 분석했다. 염기서열 분석은 automatic sequence analyzer를 이용하였다(ALF express; Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden).

결 과

1. 신이식 후에 HBsAg이 양성으로 전환되는 빈도와 임상적 특성

총 1682명의 신이식 환자는 신이식 전 모두 HBsAg이 음성이었고, anti-HBs가 양성인 환자는 472명, 음성이었던 환자는 1202명이었다. 이 환자들을 주기적으로 외래에서 관찰하던 중 AST와 ALT의 상승을 보이면서 면역혈청 검사에서 HBsAg이 양성으로 검출된 환자가 21명(1.25%)이었다. 이 21명의 환자 중에서 신이식 전에 anti-HBs가 양성이었는데 이식한 후에 HBsAg이 양성으로

Table 1. Viral Marker Changes in Patients with De Novo HBV Infection before and after Renal Transplantation

	Before transplantation			After transplantation		
No.	HBsAg	anti-HBc	anti-HBs	HBsAg	anti-HBc	anti-HBs
5	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
1	(-)	(-)	(-)	(+)	ND	ND
1	(-)	(-)	(-)	(+)	ND	ND
1	(-)	ND	(-)	(+)	ND	ND
1	(-)	ND	(-)	(+)	(-)	(-)
4	(-)	ND	(-)	(+)	(+)	(-)
1	(-)	ND	(-)	(+)	ND	(-)
1	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
1	(-)	(-)	(+)	(+)	ND	ND
3	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
2	(-)	ND	(+)	(+)	ND	ND

Table 2. Clinical Characteristics in Patients with De Novo HBV Infection after Renal Transplantation

M : F (No.)	14 : 7
Mean age (range, years)	38 (23 58)
Mean duration after renal transplantation until HBsAg turned positive (range, months)	58.5 (2 159)
Mortality (%)	6/21 (28.5)
Cause of death (cases)	Hepatic failure (3) others (3)

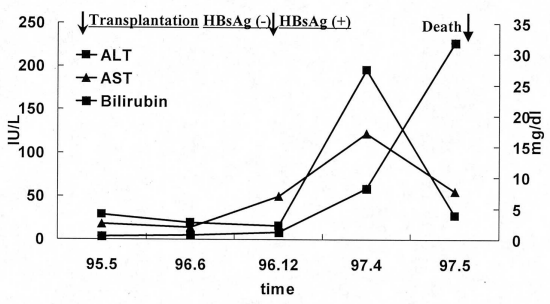

Figure 1. Clinical characteristics of patient 1. Nineteen months after transplantation, the patient showed elevated AST and ALT. He was admitted to our hospital and intensive care was started, however, he died 5 month after admission due to progressive liver failure.

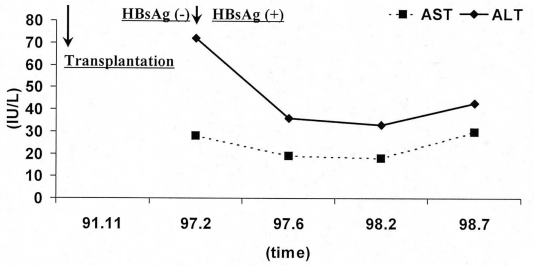

Figure 2. Clinical characteristic of patient 2. Sixty-two months after transplantation, this patient showed AST and ALT elevation with positive HBsAg. Without special care, he recovered from hepatitis within four month and has been healthy until now.

된 환자는 6명이었다(Table 1).

신이식 후에 B형 간염 항원이 양전된 환자 21명 중 남녀비는 2:1로 남자가 많았고, 평균 연령은 38세였으며 HBsAg이 양전화 할 때까지 관찰기간은 이식 후부터 평균 58.5개월이었다. 이들 HBsAg 양전 환자 중에서 6명이 사망하였는데, 간부전으로 인한 사망이 50%를 차지하였다(Table 2).

신이식 전에는 anti-HBs가 양성이었으나 신이식 후 항원이 양성으로 변한 6명의 환자 중 2명의 임상 경과는 다음과 같다(Figure 1, 2). 첫번째 환자는 외래 관찰 중 심한 간염 양상을 보여 검사를 시행하였고 그 결과 B형 간염으로 밝혀졌으며 입원 후 6개월 간 보존적 치료를 받았으나 전격성 간염으로 진행되면서 사망하였고, 두번째 환자는 외래 관찰 중에 간기능 수치의 이상이 발견되어 혈액 검사에서 B형 간염으로 밝혀졌으나 서서히

2. 대상환자의 임상 경과

Nt.	524		530		536		542		548		554		560		566		572		578		584		590	
adw2	TGC	ACG	ACT	CCT	GCT	CAA	GGC	AAC	TCT	ATG	TTT	CCC	TCA	TGT	TGC	TGT	ACA	AAA	CCT	ACG	GAT	GGA	AAT	TGC
1	---	---	-T-	---	---	---	--A	-C-	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	T--	--C	---	--C	---
2	---	---	---	---	---	---	--A	-C-	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	T--	--C	---	--C	---
3	---	---	-T-	---	---	---	--A	-C-	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	T--	--C	---	--C	---
4	---	---	-T-	---	---	---	--A	-C-	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	T--	--C	---	--C	---
5	---	---	-T-	---	---	---	--A	-C-	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	T--	--C	---	--C	---
Codon	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147
adw2	Cys	Thr	Thr	Pro	Ala	Gln	Gly	Asn	Ser	Met	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Cys
1	-	-	Ile	-	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-
3	-	-	Ile	-	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-
4	-	-	ILe	-	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-
5	-	-	Ile	-	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-

Figure 3. Amino acid sequence of 'a' determinant in patient 1. The 126th, 131st and 143rd codons show single base change in each site, but those are subtype variants of 'a' determinant which were already documented before.

Nt.	524	530	536	542	548	554	560	566	572	578	584	590
adw2	TGC ACG	ACT CCT	GCT CAA	GGC AAC	TCT ATG	TTT CCC	TCA TGT	TGC TGT	ACA AAA	CCT ACG	GAT GGA	AAT TGC
1	--- ---	-T- ---	--- ---	--A -C-	--- ---	--- ---	--T ---	--- ---	--- ---	--- T--	--C ---	--- ---
2	--- ---	-T- A--	--- ---	--A -C-	--- ---	--- ---	--T ---	--- ---	--- ---	--- T--	--C ---	--- ---
3	--- ---	-T- ---	--- ---	--A -C-	--- ---	--- ---	--T ---	--- ---	--- ---	--- T--	--C ---	--- ---
4	--- ---	-T- ---	--- ---	--A -C-	--- ---	--- ---	--T ---	--- ---	--- ---	--- T--	--C ---	--- ---
5	--- ---	-T- ---	--- ---	--A -C-	--- ---	--- ---	--T ---	--- ---	--- ---	--- T--	--C ---	--- ---

codon	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147
adw2	Cys	Thr	Thr	Pro	Ala	Gln	Gly	Asn	Ser	Met	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Cys
1	-	-	Ile	-	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-
2	-	-	Ile	Thr	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-
3	-	-	Ile	-	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-
4	-	-	Ile	-	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-
5	-	-	Ile	-	-	-	-	Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	-	-

Figure 4. Amino acid sequence of 'a' determinant in patient 2. In 126th, 127th, 131st and 143rd codons show the single base exchange at each site, but those are subtype variants of 'a' determinant reported before. Three non-sense mutations at 130th, 136th and 144th codons, are also seen.

간기능 수치는 정상으로 되었다.

3. 'a' determinant의 염기서열 분석

두 환자 공히 'a' determinant의 염기 서열이 대조 염기서열과 차이를 보였는데, codon number 126은 ACT 또는 ATT로 Thr 또는 Ile으로 나타났으나 기존에 존재하는 variant였으며, 130번은 GGC 또는 GGA로 아미노산 변화가 없는 nonsense mutation이었고, 131번은 AAC 또는 ACC로 Asn 또는 Thr이었는데 역시 기존에 존재하는 variant였으며, 136번은 TCA 혹은 TCT로 nonsense mutation이었고, 143번은 ACG 또는 TCG로 Thr 혹은 Ser으로 기존의 variant에 합당하였고 144번과 146번에서는 아미노산의 변이가 없는 nonsense mutation을 보였다. 따라서 본 연구에서 대상으로 한 환자에서는 HBV S유전자의 'a' determinant부위의 염기서열 분석에서 기존에 알려져 있지 않은 새로운 codon의 변화는 관찰하지 못했다(Figure 3, 4).

고 찰

B형 간염 바이러스의 표면 항원은 envelope의 주 구성요소이며 면역중화반응의 주대상이 되는 부위이다. 표면항원은 4개의 나선형 구조로서 친수성을 띄는 아미노산 서열 99번에서 169번 사이이며,4 구조적으로 특이적인 항원 결정부위로 생각한다. 표면항원의 중심부에 8개의 cysteine잔기가 모든 B형 간염의 아형에 공존하며 이들 간의 disulphide 결합이 표면항원의 구조를 안정화 시키는 역할을 하는데, 만일 돌연변이가 발생하면 안정적인 구조에 변화를 일으켜 면역중화반응으로부터 회피할 수 있는 것으로 생각한다.

돌연변이는 네가지 경우에 주로 생기는 것으로 생각한다. 첫째는 백신을 접종한 경우 발생할 수 있으며,5-10 둘째는 혈청학적으로는 항원 음성으로 나타나는 간염 환자 중 일부에서 볼수 있고,11-14 셋째는 단 클론 항체나 HBIG 치료를 받은 경우에 나타날 수 있으며,15-19 마지막으로 면역 억제 유무에 관계없이 오랜 기간 간염을 앓고 있는 환자에서 발견할 수 있다.20-21

Carman 등은 백신 접종 후 항체가 형성되어 있는 소아 환자에서 HBsAg이 양전됨을 발견하였고, S유전자의 587번 핵산에 점 돌연변이가 발생하여 145번 아미노산인 glycine이 arginine으로 (sG145R) 바뀌었음을 발견하였다. 이 변종은 단 클론성 또는 다 클론성 anti-HBs에 대하여 감소된 반응을 보인다.22

면역 중화 반응을 보이는 항원 인식부위는 주로 S-단백의 아미노산 120 149번 사이에 존재하며, 현재까지 알려진 모든 변이종은 이 부위의 아미노산 변화를 동반한다.23

백신 접종 환자뿐만 아니라 회복기 환자에서도 높은 친화력을 가진 항체가 HBV S-단백의 주친화성 부위에 면역학적 반응을 일으키며,24-26

peptide competition assay를 통해서도 141번에서 145번의 아미노산이 면역항체 반응에 필수적인 것으로 알려졌다.[27,29] 따라서 수동 혹은 능동 면역 후에 높은 항체 역가에도 불구하고 HBV 감염을 일으키는 경우는 앞에서 기술한 codon에 아미노산이 바뀌는 변종이 자주 관찰됨이 보고되고 있다.[5,6,8,10,27,28]

그러나 간이식 후에 HBV가 감염되는 경우는 많은 경우 변이형의 출현없이 나타나는데, 이는 anti-HBs 혈청 역가의 차이때문으로 생각한다. 즉 anti-HBs의 역가가 방어능력 이하로 떨어질 때는 면역억제제 투여에 의하여 T 세포의 면역기능이 감소함으로써 변이형의 출현없이도 HBV가 다시 복제하는 것이 가능해진다.

이러한 관점에서 저자 등이 연구한 두 명의 신이식 환자에서 HBV 'a' determinant의 염기서열은 아미노산 124번에서 147번까지 자연에 존재하는 아미노산과 그 아형의 아미노산 서열에 속하는 것으로서 새로운 변이형의 출현은 증명할 수 없었다.[31] 이점은 주항원결정부위의 변이없이 HBV 감염이 발생하였음을 의미한다.

대상 환자는 신이식 전에 존재하였던 anti-HBs가 신이식 후에 측정되지 않았기 때문에 간이식 환자에서 보고된 바와 마찬가지로 신이식 후에도 면역억제제의 장기간 투여로 인하여 면역억제가 유도된 상태에서 야생형의 HBV가 감염되었을 것으로 추정된다. HBV에 노출된 후 자연회복되어 면역능이 있는 환자에서도 면역억제상태에서는 HBV에 재감염 될 수 있을 것으로 시사되어 이식 전에 HBV에 대한 항체를 보유한 경우에도 추가 접종을 통하여 항체의 역가를 올려주는 것이 필요할 것으로 생각된다.

그리고 신이식 후에 B형 간염이 새로 생기는 비율이 1.25%였으나, 이는 외래 관찰 중 현성 간염의 형태로 발견되었던 환자만을 대상으로 한 것이므로, 임상적으로 관찰되지 않은 불현성 간염을 포함한다면 1.25%보다는 더 높은 발병률을 보일 것이다. 따라서 신이식 후 환자의 혈청 바이러스 표지자에 대한 주기적인 측정이 필요하며, 또한 이식 후에 HBV에 현성 감염된 환자 중 과반수가 간부전으로 사망함을 알 수 있었기 때문에 더욱 그 예방의 중요함을 알 수 있었다.

따라서 이식 전 HBsAg이 음성이라 할지라도 신이식 후 면역억제제 치료를 장기적으로 받는 환자들에서는 바이러스 표지자에대한 정기적 관찰이 필요하며, anti-HBs 역가를 일정 수준이상으로 유지시키는 방법이 연구되어야 할 것이다.

요 약

목적 : 장기이식 후 HBV 감염이 발생할 수 있으며, 혈청의 anti-HBs 검출은 면역을 의미하며 야생형에 대한 재감염은 되지 않는 것으로 알려져 있다. 표면 유전자 중 'a' determinant는 B형 간염의 항원성을 나타내는 특이부위로 아미노산 124번에서 147번 사이를 지칭하는데, 이 부위의 아미노산 변화는 면역중화로부터 도피하는 주 기전으로 알려져 있다. 최근 B형 간질환 환자에서 간이식 후 HBIG 투여 중 B형 간염 바이러스에 재발된 경우에서 'a' determinant 부위에 변이가 출현하는 것으로 알려져 있다. 하지만 신이식 환자의 경우는 B형 간염의 발생률과 표면 항원의 유전자 변이에 대한 연구가 별로 없는 실정이다. 따라서 본 연구자들은 신이식 전 HBsAg음성임에도 불구하고, 신이식 후 HBsAg이 양전된 환자의 빈도를 알아보았고, 이들 중 재감염의 이유가 'a' determinant의 변이형의 감염으로 인한 것인지를 알아보고자 하였다. **대상 및 방법 :** 본원에서 신이식을 시행한 환자 중 이식 전 HBsAg음성이었으나 이식 후 HBsAg이 양전된 환자를 조사하였다. 이중 이식 당시에 anti-HBc와 anti-HBs만 양성이었으나 이식 후 HBsAg이 양전된 환자 2명에서 S유전자의 'a' determinant부위의 염기서열을 분석하였다. 환자의 혈청은 신이식 후에 HBsAg이 관찰된 시점에서 채취하였고, 바이러스 DNA를 추출한 후 시발체를 이용하여 PCR증폭을 시행하였다. 이어서 증폭산물을 정제한 후에 ligation 및 transformation을 시행한 후 plasmid DNA를 추출하였다. 'a' determinant에 대한 염기서열은 자동서열 분석기를 이용하여 알아보았다. **결과 :** 신이식을 시행한 환자 1682명 중 21명(1.25%)이 신이식 후에

HBsAg 양전되었고, 이들 중 6명이 경과 관찰 중 사망하였으며, 50%는 간부전으로 사망하였다. 이들 중 이식 전 anti-HBs양성이 6명이었다. 두명의 환자에서 HBV 'a' determinant의 염기서열은 기존에 알려진 야생형과 부합하였으며, 새로이 관찰되는 유전자 변이형은 없었다. 결론 : 신이식 환자에서 이식 전에 anti-HBs 양성인 경우에도 이식 후 면역억제 상태에서 HBV 재감염이 'a' determinant의 변이 없이도 가능하였다.

참고문헌

1. Ashton-Rickardt PG, Murray K. Mutation of the hepatitis B virus surface antigen that define some antigenically essential residues in the immunodominant a region. J Med Virol 1989;29:196-203.
2. Mangold CM, Unckell F, Werr M, Streeck RE. Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region. Virology 1995;211:535-543.
3. Mangold CM, Streeck RE. Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. J Virol 1993;67:4588-4597.
4. Stirk HJ, Thornton JM, Howard CR. A topological model for hepatitis B surface antigen. Intervirology 1992;33:148-158.
5. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. Lancet 1990;336:325-329.
6. Fujii H, Moriyama K, Sakamoto N, et al. Gly 145 to Arg substitution in HBs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. Biochem Biophys Res Comm 1992;184:1152-1157.
7. Zuckermann AJ, Harrison TJ, Oon CJ. Mutants in the S region of hepatitis B virus. Lancet 1994;343:737-738.
8. Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, et al. Mutations within the s gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine. Paediatric Res 1992;32:264-268.
9. Hino K, Okuda M, Hashimoto O, et al. Glycine-to-arginine substitution at codon 145 of HBsAg in two infants born to hepatitis B e antigen-positive carrier. Dig Dis Sci 1995;40:566-570.
10. Karthigesu VD, Allison LM, Fortuin M, Mendy M, Whittle HC, Howard CR. A novel hepatitis B virus variant in the sera of immunized children. J Gen Virol 1994;75:443-448.
11. Wallace LA, Echevarria JE, Echevarria JM, Carman WF. Molecular characterization of envelope antigenic variants of hepatitis B virus from Spain. J Inf Dis 1994;170:1300-1303.
12. Carman WF, Korula J, Wallace L, MacPhee R, Mimms L, Decker R. Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. Lancet 1995;345:1406-1407.
13. Ljunggren KK, Hansson BG, Wallmark E, Croxson MC, Kidd AH, Nordenfelt E. Reactivation of hepatitis B virus infection with an unusual pattern of serological markers. Scand J Infect Dis 1992;24:657-660.
14. Preisler-Adams S, Schlayer HJ, Peters T, Hettler F, Gerok W, Rasenack J. Sequence analysis of hepatitis B virus DNA in immunologically negative infection. Arch Virol 1993;133:385-396.
15. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. Hepatology 1996;24:489-493.
16. Busstra M, de Man BA, Heijtink RA, et al. Failure of HBIg therapy after HBV related OLT is due to a reduction of HBsAg neutralisation. J Hepatol 1995;23:103.

17. Wakita T, Tokushige K, Moradpour D, et al. Antigenic alternation of hepatitis B virus core protein in fulminant hepatitis. Hepatology 1994;20:295A.
18. Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, et al. S Gene escape mutants as a cause of HBV reinfection in patients who received HBIg post-OLT. Hepatology 1995;22:150.
19. McMahon G, Ehrlich PH, Moustafa ZA, et al. Genetic alternations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological analysis of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody-treated liver transplant patients. Hepatology 1992;15:757-766.
20. Moriyama K, Nakajima E, Hohjoh H, Asayama R, Okochi K. Immunoselected hepatitis B virus mutant. Lancet 1991;337:125.
21. Sastrosoewignjo RI, Sandjaja B, Okamoto H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Indonesia. J Gastroenterol Hepatol 1991;6:491-498.
22. Waters JA, Kennedy M, Voet P, et al. Loss of the common 'a' determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. J Clin Invest 1992;90:2543-2547.
23. Pride MW, Thanavala YM, Strick N, Houghten RA, Neurath AR. Toleration of amino acid substitutuons within hepatitis B virus envelope protein epitopes established by peptide replacement set analysis. II. Region S(122-136). Pept Res 1992;5:217-226.
24. Motti C, Nuzzo M, Meola A, et al. Recognition by human sera and immunogenicity of HBsAg mimotopes selected from an M13 phage display library. Gene 1994;146:191-198.
25. Steward MW, Partidos CD, D'Mello F, Howard CR. Specificity of antibodies reactive with hepatitis B surface antigen following immunization with synthetic peptides. Vaccine 1993;11:1405-1414.
26.Bhatnagar PK, Papas E, Blum HE, et al. Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant . Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:4400-4404.
27. Oon CJ, Lim GK, Ye Z, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus vaccine variants in Singapore. Vaccine 1995;13:699-702.
28. Harrison TJ, Hopes EA, Oon CJ, Zanetti AR, Zuckermann AJ. Independent emergence of a vaccine ?induced escape mutant of hepatitis B virus. J Hepatol 1991;13(Suppl 4):S105-S107.
29. Neurath AR, Pride MW, Strick N, Thanavala YM. Toleration of amino acid substitutions within hepatitis B virus envelope protein epitopes established by peptide replacement set analysis. I. Region S(139-147). Pept Res 1990;3:116-122.
30. Chirara MM, Chetsanga CJ. Variant of hepatitis B virus isolated in Zimbabwe. J Med Virol 1994;42:73-78.
31. Ulrike Protzer-Knolle, Uta Naumann, Ralph Bartenschlager, et al. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation.. Hepatology 1998;27:254-263.